Über die proteolytischen Pankreasfermente und ihre Teilfermente

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der Bayerischen Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Charlotte Bachmann

Bayerische Druckerei & Verlagsanstalt G.m.b.H., München, Müllerstraße 27

Gedruckt mit Genehmigung der Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Referent: Professor Dr. Hahn

Meinen lieben Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153721_0257

Das Pankreas, die Bauchspeicheldrüse, liegt hinter dem Magen, die Zusammensetzung ist die aller drüsigen Organe. Kurz unterhalb des Pylorus mündet der Ausführungsgang in das Duodenum, der den Saft in den Darm abgibt. Der Saft ist eine farblose, geruchlose Flüssigkeit von stark alkalischer Reaktion. Er enthält in der Hauptsache Wasser und nur etwas über 1% Trockensubstanz, nämlich Eiweiß, Fett, anorganische Salze, darunter das Natriumkarbonat Na_2CO_3. Der wichtigste Bestandteil sind seine Fermente: ein amyloytisches, ein lipolytisches und 2 proteolytische: das Trypsin und das Erepsin.

Zwei Ziele sind für die Entwicklung der modernen Enzymforschung in den letzten Jahren richtunggebend geworden: ihre Gewinnung in enzymatisch einheitlicher Form, ihre Trennung von enzymatischen Begleitern durch die Adsorptionsmethoden und die Untersuchung von Spezifität und Wirkungsweise jeder einzelnen enzymatischen Komponente. Schon aus den Jahren 1861 und 1862 hat man Angaben über Trennung von Enzymen mit Adsorptionsmitteln. Es waren vor allem Ernst Brücke, A. Danilewsky, I. Cohnheim und etwas später (1872) O. Hammersten, die Beobachtungen und Untersuchungen darüber machten. Dann traten diese Forschungen mehrere Jahrzehnte in den Hintergrund. R. Willstätter und neben ihm E. Waldschmidt-Leitz brachten 1922 die bewährten Adsorptionsmethoden zur Trennung des Trypsins von Lipase und Amylase in Präparaten aus Pankreasdrüsen. Erst wurde die Lipase, die stärkere, saure Eigenschaften besitzt als Amylase und Trypsin, von diesen zwei Enzymen getrennt. Sie läßt sich aus den Glyzerinauszügen der Pankreasdrüse durch Aluminiumhydroxyd und durch Kaolin adsorbieren und mit ammoniakkalischem Phosphat eluieren. Darauf werden Amylase und Trypsin, das stärkere elektropositive Eigenschaften hat, mit Kaolin fraktioniert. Durch Begleitstoffe, die Hemmungskörper sind, geht anfangs bei der Einwirkung von Kaolin ein Teil der Amylase in das Adsorbat und zugleich verhindern sie die Adsorption des Trypsins. Nun verarmt die Enzymlösung an den Begleitstoffen. Das Trypsin wird vom Kaolin adsorbiert, die Amylase bleibt zu 70—75% zurück. Das proteolytische Enzym wird durch Ammoniumphosphat eluiert.

In der Literatur der physiologischen Chemie findet man schon um das Jahr 1900 herum Angaben über das Vorhandensein von zwei verschiedenen proteolytischen Enzymen im Pankreas. W. M. Bayliß und E. H. Starling berichten über die Hydrolyse von Kasein und Fibrin durch nicht aktiviertes Drüsensekret, K. Mays und H. M. Vernon über Verschiebungen in der Wirksamkeit gegenüber Protein

und Peptonen. Sie haben zuerst die Idee vom Vorkommen des Erepsins im Pankreas. Mays meint, vielleicht hat aber das Trypsin auch nur ereptische Eigenschaften. Vernon nimmt dasselbe an und hält das Pankreaserepsin für verschieden vom Darmerepsin. Einige Jahre später beobachtete auch J. Wohlgemuth eine peptolytische Wirkung bei nicht aktiviertem Sekret. G. Schaeffer und E. Terroine prüften zuerst die spezifischen Wirkungen von aktiven und nicht aktiviertem Pankreassaft. Sie nahmen zwei verschiedene proteolytische Enzyme im Drüsensekret an; das eine davon, das Trypsin, aktiviert durch Enterokinase, sei spezifisch für die Hydrolyse höher molekularer Proteine, das zweite, das ereptische Enzym, spaltet Peptide und Casein und der Aktivator wäre ohne Bedeutung für letzteres. Durch eine Dialyse dachten sie die eine der beiden Enzymwirkungen für sich allein zu erhalten. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck berichten nun über die Trennung dieser beiden Enzyme, die ihnen durch Adsorption gelungen ist. „Die Anwendung des Verfahrens der fraktionierten Adsorption, das schon R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz für die Trennung von Lipase, Trypsin und Amylase in den Auszügen der Pankreasdrüse und in einem anderen Beispiel für die Zerlegung der Verbindung von Enterokinase und Trypsin gedient hat, hat sich auch in diesem Falle als brauchbar erwiesen. Die bei der Trennung der drei wichtigsten pankreatischen Enzyme gewonnenen Erfahrungen hatten für das Trypsin in dem geprüften Reinheitsgrade ergeben, daß seine basische Natur überwiegt; diese Anschauung leitete man ab aus den Beobachtungen über seine träge und unvollkommene Adsorption durch das basische Adsorbens Tonerde, das zur Aufnahme der Lipase diente, sowie über die viel größere Affinität zu dem sauren Adsorbens Kaolin, die es von der begleitenden Amylase abzutrennen erlaubte. Das Erepsin der Pankreasdrüse, das die vorliegende Untersuchung von dem tryptischen Drüsenenzym zu unterscheiden lehrt, teilt das beschriebene Adsorptionsverhalten mit diesem nicht, seine sauren Eigenschaften sind stärker ausgeprägt. So führt die Adsorption durch Tonerde und die Elution der gewonnenen Adsorbate beispielsweise in den rohen, angesäuerten Drüsenauszügen, bei mehrmaliger Anwendung zu einer vollständigen Trennung der beiden Proteasen; in der Restlösung der letzten Adsorptionsvornahme verbleibt das Trypsin in guter Ausbeute frei von ereptischer Wirkung, und die Elution der Tonerdeadsorbate liefert die einheitliche ereptische Komponente.

Die Trennung der beiden Enzymwirkungen, wie sie in dieser Abhandlung beschrieben wird, gemessen an den als spezifisch erkannten Substraten, der Gelatine für die tryptische, dem Leucylglycin für die ereptische Komponente, ist als ein eindeutiger Beweis für die Existenz zweier verschiedener enzymatischer Individuen zu betrachten. Es ist sehr beachtenswert, daß die beiden in der Spezifität ihrer Wirkung, wie man annimmt, nahe verwandten

Proteasen so deutliche Unterschiede in den Adsorptionseigenschaften aufweisen; man darf in diesem Verhalten eine Bestätigung der Anschauung erblicken, daß die Fermente — und in diesem Falle 2 Vertreter aus der nämlichen Gruppe enzymatischer Stoffe — nicht als mehr oder weniger spezifische Protoplasma-Bestandteile nur von besonderer Dispersität, sondern als bestimmte und unterscheidbare chemische Individuen reagieren.

Die Isolierung der einheitlichen, enzymatischen Komponenten eröffnet den Weg zu einer gesicherten Prüfung ihrer spezifischen Wirkung, wie auch der Bedeutung des Hilfsstoffs Enterokinase für die Spezifität des tryptischen Enzyms.

Die Untersuchungen von Schaeffer und Terroine, führen zu der Feststellung, daß nach dreitägiger Dialyse frischen Pankreassaftes gegen destilliertes Wasser keine Wirkung des Sekretes gegen Eieralbumin mehr wahrnehmbar ist und daß die schon im nicht aktivierten Safte meßbaren Wirkungen auf gewisse andere Substrate wie Casein, Histon oder Peptonlösung, die dem ereptischen Enzym zugeschrieben werden, durch Enterokinase nun keine Steigerung mehr erfahren; dagegen bleibt bei einer gleichlaufenden Dialyse gegen verdünnte Kochsalzlösung die tryptische Wirkung, gemessen an der Verdauung von Eiereiweiß, erhalten und man beobachtet auch bei der Hydrolyse der schon vom Erepsin angreifbaren Substrate hier eine deutliche Steigerung durch Kinase.

Die Erscheinungen, die Schaeffer und Terroine beschreiben, lassen sich auf andere Ursachen zurückführen als sie von diesen Forschern angenommen werden. Die Prüfung der beiden Enzyme mittels spezifischer Wirkungen ergibt, daß bei der Dialyse keine Trennung der enzymatischen Komponenten eintritt, man beobachtet vielmehr eine allmähliche und gleichmäßige Zerstörung beider Enzyme. Sodann zeigt sich, daß im Verlaufe der Dialyse, wie zu erwarten war, die Selbstaktivierung des Trypsins durch die aus der Drüsensubstanz gebildete Enterokinase einsetzt und dazu führt, daß sich nach einiger Zeit für den zugesetzten Aktivator keine Wirkung mehr wahrnehmen läßt. Bei Gegenwart von NaCl dagegen findet man den Vorgang der Selbstaktivierung gestört, er verläuft viel langsamer.

Eine Trennung der pankreatischen Proteasen oder auch nur die Zerstörung einer einzelnen enzymatischen Komponente läßt sich durch Dialyse nicht erreichen.

Die Trennung der beiden Proteasen, wie sie im folgenden beschrieben wird, beruht auf ihrem verschiedenen Adsorptionsverhalten gegen Tonerde. Für das Trypsin haben R. Willstätter und E. Waldschmidt-Leitz angegeben, daß es in den angesäuerten Auszügen der Pankreasdrüse durch Tonerde nur in geringem Maße aufgenommen wird, gilt indessen nicht zugleich für das ereptische Enzym der Drüse; vergleichende Versuche haben ergeben, daß die

Adsorption dieses Enzyms durch die Tonerde in saurer Lösung, beispielsweise bei $p^H = 4{,}7$, begünstigt, im neutralen Medium dagegen zurückgedrängt wird. Diese Unterschiede in den Adsorptionsaffinitäten benutzt das eingeschlagene Verfahren zur Isolierung der enzymatischen Komponenten; sie bewirken, daß nach mehrmaliger, z. B. dreimaliger Wiederholung der Adsorptionsvornahme die Mutterlauge frei von Erepsin gefunden wird, während in den Elutionen der Adsorbate, beispielsweise mit verdünntem Ammoniak oder auch mit Alkaliphosphat, das Erepsin angereichert wird, ohne daß sich in ihnen tryptische Wirkung nachweisen ließe. So erhält man die beiden Enzyme, wenn auch nicht in enzymatisch, so doch in proteolytisch einheitlicher Lösung; nach den Erfahrungen wird nämlich das Trypsin in den Mutterlaugen der Adsorption mit der Hauptmenge der Pankreasamylase, das Erepsin in den Elutionen mit dem lipatischen Enzym der Drüse vergesellschaftet sein.

Die nachstehende Tabelle beschreibt die Adsorption der beiden Enzyme durch ein Tonerdepräparat der Sorte C, und zwar bei wechselndem p^H.

(R. Willstätter und H. Kraut schreiben von diesem Tonerdepräparat folgendes:

„Ueber ein Tonerde Gel von der Formel $Al(OH)_3$: Bei der Abscheidung des Aluminiumhydroxyds aus Aluminiumsulfat sucht man die Base Tonerde zu gewinnen. Die mit konzentriertem Ammoniak gewonnene Sorte B zeigt aber keine basischen, sondern ausgesprochen saure Eigenschaften, die vorsichtiger, nämlich mit verdünntem Ammoniak bereitete Sorte C hat zwar keinen sauren, aber auch keinen ausgeprägt basischen Charakter. Das Präparat C ist eine schwach gelbstichige, flockige und etwas plastische Masse, die zum Unterschiede von den sauren Tonerdesorten an der Glaswand stark klebt.")

Man verdünnte zum Versuche 3,5 ccm Glyzerinauszug der getrockneten Drüse (enthält 12,1 T-(e) und 0,00257 P.-Er.-E.) mit dem gleichen Volumen Wasser und adsorbierte sie mittels 1,0 ccm Tonerdesuspension (= 10,4 mg Al_2O_3) nach Zusatz von a) 0,08 ccm n-Essigsäure, b) 0.25 ccm n-Acetatpuffer von $p^H = 5{,}6$ und c) ohne Zusatz, also bei neutraler Reaktion.

Tabelle:

Tonerdeadsorption bei wechselndem p^H —

Angew. p^H	Trypt. Wirkg. ccm 0,2-n-KOH.	Adsorbiert T-(e)	%	Erept. Wirkg. ccm 0,2-n-KOH.	Adsorbiert P.-Er.-E.	%
7,0	0,41	6,29	52	1,16	0,00067	28
5,6	0,61	0	0	0,86	0,00123	50
4,7	0,59	0	0	0,76	0,00140	55
3,8	0,61	0	0	0,79	0,00135	53
n/100-essigs.	0,54	1,68	13	0,76	0,00140	55

(T.-[e] = die Einheit der tryptischen Leistung entspricht einem in alkoholischer Lösung gemessenen Aziditätszuwachs von 0,90 ccm, 0,2 n-Lauge. Als Pankreaserepsineinheit P.-Er.-E. ist das Tausendfache derjenigen Enzymmenge bezeichnet, für welche sich unter den Bedingungen der Bestimmung die Konstante der monomolekularen Reaktion gleich 0,001 ergibt; die berechnete Reaktionskonstante bezeichnet daher zugleich den Gehalt der Analysenprobe an Pankreaserepsineinheiten.)

Die Elution des Erepsins aus Tonerdeadsorbaten gelingt, wie schon angegeben, in guter Ausbeute, sei es mit verdünntem Ammoniak, sei es mit alkalischer Phosphatlösung, während die Anwendung neutraler Phosphatmischungen das Enzym nicht zu eluieren erlaubt. Die folgende Tabelle vergleicht die Wirkung der geprüften Eluentien; man nahm die Adsorption vor, wie oben beschrieben, und zwar bei $p^H = 4,7$, und behandelte die gewonnenen Adsorbate mit je 7,0 ccm der Elutionsflüssigkeit, welche einen Gehalt von 17% Glyzerin aufwies; von der in der Zentrifuge abgetrennten Elution dienten aliquote Teile zur Bestimmung der Enzymwirkungen; das Adsorbat enthielt zufolge der Bestimmung der Adsorptionsmutterlauge 12,1 T-(e) neben 0,0014 P.-Er.-E.

Tabelle:

Elution der Tonerdeadsorbate.

Angew. Eluens	Trypt. Wirkg. ccm 0,2-n-KOH.	Eluiert T.-(e)	%	Erept. Wirkg. ccm 0,2-n-KOH.	Eluiert P.-Er.-E.	%
1/3 mol Phosphat von p^H 7,0 . . .	0,10	1,26	10	0,00	0	0
1/3 mol Phosphat von p^H 8,2 . . .	0,00	0	0	0,50	0,00076	55 „
n/25 NH_3	0,00	0	0	0,54	0,00093	67 „

Pankreas und Darmerepsin sind nun verglichen worden. Sie stimmen im Reaktionsoptimum überein, die Abhängigkeit der enzymatischen Wirkung von der Wasserstoffionenkonzentration ist gleich. E. Waldschmidt-Leitz und A. Schäffner bestätigen, daß das pankreatische Enzym, wie es auch für das Darmerepsin von K. G. Dernby festgestellt worden war, bei einem p^H von 7,8 am günstigsten wirkt. Es folgen 2 Tabellen von E. Waldschmidt-Leitz, die die vergleichende Hydrolyse durch Pankreas und Darmerepsin bringen.

„Tabelle:

Peptidhydrolyse durch Erepsin aus Pankreas- und Darmsaft.

(1,0 ccm Pankreassaft, gallenfrei, durch Eingabe von 0,1-n-HCl gewonnen bzw. 2,0 ccm Darmsekret aus Vellaschlinge, auf Injektion von 1%igem $NaHCO_3$ [0,9% NaCl enth.] gewonnen; 0,001 Mol Peptid, in 2,00 ccm und Ammoniak-Ammonchloridpuffer [1:2] gelöst; Volumen des Bestimmungsansatzes 10,1 ccm $p^H = 7,8$; 30°.)

Peptid	Darmerepsin: Dauer in Min.	Darmerepsin: Acid.-Zuw. in ccm 0,2-n-KOH.	Darmerepsin: k_1 monom. ber.	Pankreaserepsin: Dauer in Min.	Pankreaserepsin: Acid.-Zuw. in ccm 0,2-n-KOH.	Pankreaserepsin: k_2 monom. ber.	$k_1 : k_2$
Glycyl-glycin.	240	0,47	0,00017	300	0,29	0,000086	2,0
Alanyl-glycin	120	0,74	0,00058	180	0,67	0,00035	1,7
Leucyl-glycin	120	0,44	0,00033	180	0,32	0,00016	2,0

Tabelle:

Spezifität von Darmerepsin, Pankreaserepsin und Pankreastrypsin.

(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive Hydrolyse.)

Nr.	Substrat	Enzym: Darmerepsin	Enzym: Pankreaserepsin	Enzym: Pankreastrypsin (akt.)
1	Alanyl-glycin	+	+	—
2	Glycyl-tyrosin	+	+	—
3	Glycyl-glycin	+	+	—
4	Leucyl-glycin	+	+	—
5	Leucyl-alanin	+	+	—
6	Pepton (ex albumine, Merck)	—	—	+
7	Clupein	—	—	+
8	Thymushiston	—	—	+
9	Casein	—	—	+
10	Fibrin	—	—	+
11	Gelatine	—	—	+
12	Gliadin	—	—	+
13	Zein	—	—	+
14	Eieralbumin	—	—	+
15	Ricinus-globulin	—	—	+

Es kommt hinzu, daß sowohl das Adsorptionsverhalten der beiden Enzyme gegenüber Tonerde, wie schon erwähnt, wie auch die Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Wasserstoffzahl, beschrieben wurde und die hier erneut belegt werden soll, übereinstimmend gefunden wird. Es ist daraus zu folgern, daß für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, des Darmerepsins und des Pankreaserepsins, nun keine Anhaltspunkte mehr vorliegen, daß sie vielmehr als identisch zu betrachten sind."

Somit hat eine mühevolle Entwicklung ihren Abschluß gefunden. Alle Befunde drängten theoretisch auf dieses Resultat hin, seitdem O. Cohnheim 1901 das Erepsin im Darm gefunden hatte. Das Pankreas enthält also neben dem Trypsin ein Enzym: das Erepsin, eine Peptidase, und diese ist mit der des Darmsaftes identisch.

Die Wirkung des Erepsins vom Pankreas sowie vom Darm bezieht sich nur auf die Hydrolyse einfacher Peptide. Die Wirkungen von Trypsin und Erepsin sind stark verschieden. Trypsin hydrolysiert keine Peptide, und Erepsin weder Pepton noch Protamin oder Histon oder irgendein anderes Protein. Trypsin hydrolysiert diese Präparate. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck

geben eine Uebersicht über die Spezifität von Pankreastrypsin und -erepsin.

„Sodann haben wir an den besprochenen Beispielen den Einfluß der Aktivierung durch Enterokinase auf die Aktivität des tryptischen Enzyms geprüft, das unter den Bedingungen seiner Darstellung in nicht aktivierter Form erhalten wird und das nun, wie aus der nachfolgenden vierten Mitteilung hervorgeht, nach der Abtrennung des Erepsins auch keine Selbstaktivierung mehr erleidet. Die Ergebnisse dieser Versuche lassen erkennen, daß für die Spaltung höher molekularer Proteine, wie es ja bekannt ist, die Aktivität des Enzyms durch die Aktivierung mit Enterokinase bedingt wird, daß dagegen in gewissen anderen Fällen, so bei Histon, Protamin oder auch Pepton, das Enzym auch ohne den Aktivator beträchtliche proteolytische Wirkungen ausübt. Besondere vergleichende Versuche haben erwiesen, daß die Hydrolyse in diesen Fällen nicht etwa auf eine gesteigerte Aktivität von spurenweise aktiviertem Enzym, sondern lediglich auf die Wirkung des nicht aktivierten Trypsins zurückzuführen ist. Diese Befunde verdienen insofern eine gewisse Beachtung, als durch sie auf einem anderen Wege der Beweis erbracht wird, daß das Trypsin in der Pankreasdrüse nicht, wie man früher annahm, in unfertiger, in Zymogenform gebildet und erst durch die Enterokinase in aktives Enzym umgewandelt wird, sondern daß dem Aktivator nur die Bedeutung eines Hilfsstoffs zukommt.

Tabelle:

Spezifität von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin.

(Angaben bedeuten: — = keine nachweisbare, + = positive, ++ = verstärkte Hydrolyse.)

Nr.	Substrat	Enzym		
		Erepsin	Trypsin	Trypsin + Enterokinase
1	Alanyl-glycin	+	—	—
2	Glycyl-tyrosin	+	—	—
3	Glycyl-glycin	+	—	—
4	Glycyl-alanin	+	—	—
5	Leucyl-glycin	+	—	—
6	Leucyl-alanin	+	—	—
7	Leucyl-glycin	+	—	—
8	Pepton (ex albumine, Merck)	—	+	+
9	Clupein	—	+	+
10	Thymushiston	—	+	+
11	Casein	—	—	+
12	Fibrin	—	—	+
13	Gelatine	—	—	+
14	Gliadin	—	—	+
15	Zein	—	—	+

Tabelle:

Spezifität des Erepsins.

Man verwandte zu den Proben je 0,001 Mol des Peptids (aber für Glycyl-tyrosin 0,00047 Mol) und 0,00037 P.-Er.-E., deren Einwirkung bei $p^H = 7{,}8$ (eingestellt durch 2,00 ccm n-Ammoniak-Ammonchloridpuffer von $p^H = 7{,}8$ [bei 30 ° 0,35 ccm n-NH_4]) und 30 nach 2 Stunden gemessen wurde.

Peptidhydrolyse durch Pankreaserepsin.

(Angaben bedeuten ccm 0,2 n-KOH.)

Nr.	Angew. Peptid	Gemess. Spaltung
1	Alanyl-glycin	2,28
2	Glycyl-tyrosin	0,39
3	Glycyl-glycin	0,15
4	Glycyl-alanyl	0,45
5	Leucyl-glycin	1,07
6	Leucyl-alanin	0,12 "

Nach Fischer und Abderhalden gehören die ersten in der Tabelle angeführten Substrate zu den hydrolysierbaren, die vier letzten dagegen zu den nicht hydrolysierbaren bei ihrer qualitativ verstandenen Einteilung. Man nimmt an, daß das verwendete Enzymmaterial ereptisch nur noch wenig wirksam war und im Verlauf der Versuche noch mehr Aktivität einbüßte.

Die Prüfung der Spaltbarkeit von Pepton und einer Reihe von Proteinen nahm man in derselben Weise vor, wie die Hydrolyse der Peptide. In keinem Versuch war eine nachweisbare Aziditätszunahme eingetreten.

„Spezifität des Trypsins. a) Peptide: Die Hydrolyse einfacher Peptide durch das enzymatisch einheitliche Trypsin bestimmten wir mit und ohne die vorherige Aktivierung des Enzyms durch Enterokinase, auch die Gegenwart des Aktivators bewirkte in keinem der untersuchten Fälle eine nachweisbare Spaltung. b) Pepton, Proteine: Die Ergebnisse der Versuche über die Spaltung von Pepton und von einfachen und höher molekularen Proteinen durch Trypsin und ihre Abhängigkeit von der Gegenwart der Enterokinase sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die Prüfung von Substraten aus den nicht vertretenen Gruppen der Albumine und Globuline unterblieb, da ihre tryptische Hydrolyse nur sehr langsam erfolgt; Zusatz geringer Mengen von Albumin zu tryptischen Verdauungsgemischen bewirkt, wie ja bekannt ist, eine bedeutende Herabsetzung der Enzymwirkung zufolge der Beschlagnahme des Enzyms; für die Prüfung eines Globulins andererseits, für dessen Lösung es höherer Salzkonzentration bedarf, erwies sich diese als störend, da sie eine starke Hemmung der Enzymwirkung zur Folge hatte. Es ist indessen nicht daran zu zweifeln, daß die Vertreter dieser beiden Gruppen von Proteinen, die nach den Erfahrungen

der Literatur und nach eigenen nur langsam von aktiviertem Trypsin, und nur von diesem, angespalten werden, in diesem Sinne qualitativ den übrigen in der Tabelle angeführten höher molekularen Proteinen zuzuordnen sind.

Tabelle:

Tryptische Hydrolyse von Pepton und Proteinen.

(30°; p^H = 8,9 [eingest. d. n-Ammoniak-Ammonchloridpuffer]; ½stündige Aktivierung mit 0,30 ccm Kinaselösung; Substrate in 5,0 ccm H_2O, bei Nr. 13 und 14 10% Alkohol enthaltend.)

Nr.	Substrat	Menge	Angew. T. (e) nicht aktiv	Angew. T. (e) aktiv	Dauer Std.	Acid. Zuw. ccm 0,2-n-KOH nicht aktiv	Acid. Zuw. ccm 0,2-n-KOH aktiv
1	Pepton (ex alb)	0,15	1,84	—	3	0,49	—
2	„	0,15	—	0,92	1	—	0,58
3	Clupeinsulfat	0,10	1,84	—	3	0,58	—
4	„	0,10	—	0,92	1	—	0,56
5	Histonsulfat	0,10	1,84	—	1	0,20	—
6	„	0,10	1,84	—	3	0,47	—
7	„	0,10	—	0,92	1	—	0,64
8	Casein	0,15	1,84	0,92	1	0,01	0,72
9	Fibrin	0,15	1,84	—	3	0,00	—
10	„	0,15	—	0,92	1	—	0,35
11	Gelatine	0,40	1,84	—	3	0,02	—
12	„	0,40	—	0,26	0,33	—	0,44
13	Gliadin	0,15	1,84	0,92	1	0,00	0,29
14	Zein	0,15	1,84	0,92	1	0,00	0,25"

Schaeffer und Terroine hielten Trypsin und Trypsin + Enterokinase für zwei verschiedene Enzyme. Sie nahmen nach der damals herrschenden Ansicht über die Wirkungsweise der Enterokinase an, daß diese eine enzymatische Umwandlung des Trypsins aus seinem Zymogen bewirkte. Untersuchungen von Cohnheim und von G. Schaeffer und E. Terroine und Angaben der Literatur über die Hydrolyse von Peptonen, Protaminen, von Histon und von Casein durch Erepsin bedürfen nach Waldschmidt-Leitz der Berichtigung. Es bezieht sich alles nur auf die Wirkung des einen Enzyms, Trypsin oder der drei proteolytischen Enzyme: Pepsin, Trypsin und Erepsin. Die angeführten Beobachtungen sind auf die Verunreinigung der Lösungen des Erepsins, die man stets so aus der Darmschleimhaut gewinnt, zurückzuführen. Die peptolytische Komponente war nicht aktiviertes Enzym. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck teilen die proteolytischen Enzyme nun folgendermaßen ein: „Die neuen Erkenntnisse über die Spezifität der Pankreasenzyme führen zu einer scharfen Unterscheidung mehrerer Typen proteolytischer Enzyme. Zur ersten Gruppe der Peptidasen gehört das Erepsin, als dessen spezifische Substrate einfacher Peptide, z. B. Di- oder Tripeptide, zu gelten haben; eine zweite Gruppe umfaßt die Enzyme vom Typus des nichtaktivierten Trypsins, dessen Wirkungen zwar nachgewiesen, aber noch nicht mit einem

streng spezifischen Substrate gekennzeichnet werden können; für die dritte Gruppe spezifisch wirkender proteolytischer Individuen ist das aktivierte Trypsin, also das System Trypsin + Enterokinase, als charakteristischer Vertreter anzusehen, für die 4. Gruppe endlich das Pepsin, dessen spezifische Wirkungen noch nicht mit Sicherheit zu beschreiben, aber zu unterscheiden sind; die Verschiedenheit ihrer Wirkungen läßt sich auch nicht, wie die weitgehend differenzierte Spaltbarkeit beispielsweise von Eieralbumin oder Globulin einerseits, von Gliadin, Gelatine oder Histon anderseits erkennen läßt, allein auf einen verschiedenen Ionisierungszustand der Substrate zurückführen. Die Hydrolyse der höher molekularen Proteine ist zufolge den Angaben der Literatur durch keine der aus nur zwei Komponenten bestehenden möglichen Kombination von Pepsin, Trypsin und Erepsin vollständig; und in den einfachsten Fällen, für den Abbau der Protamine, erweist sich nur das Pepsin als entbehrlich. Die Folgerung verschiedener Angriffspunkte und verschiedener Reaktionswege, die die Literatur erhebt, ist mit der Feststellung zu ergänzen, daß für eine gegenseitige Vertretbarkeit der vier Enzymtypen — Pepsin, Trypsin-Enterokinase, Trypsin, Erepsin — bis heute keine Anhaltspunkte vorliegen, und daß daher ihr Angriff auf spezifische Strukturen zu beziehen sein wird. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen über die Wirkungsweise der verschiedenen Proteasen zwingen zu einer strengen chemischen Auffassung der Proteinstruktur. Nicht nur, daß die Wirkung des enzymatischen einheitlichen Trypsins, die in den Ausführungen von C. Oppenheimer als rein desagregierende behandelt wird, durch den Zuwachs freier Carboxylgruppen, der sehr bedeutend ist, gemessen werden kann, und daß man, wie aus unseren Versuchen hervorgeht, dabei die Abspaltung einer sehr beträchtlichen Menge freier Aminosäuren beobachtet; es wird aus einer demnächst zu veröffentlichen Untersuchung des einen von uns mit E. Simons zu ersehen sein, daß auch die Wirkung des Pepsins, dem noch ausgesprochenere depolymerisierende Funktionen zugesprochen werden, in beträchtlichem Ausmaße in der Freilegung von Carboxyl und Aminogruppen besteht."

Die Aktivierung des Trypsins nimmt eine besondere Stellung ein. Für die Spaltung bestimmter Substrate ist der Aktivator nötig, nämlich der Proteine und ihrer höheren Abbauprodukte, im Gegensatz dazu ist für die Spaltung der Polypeptide seine Gegenwart entbehrlich. Schon im Jahre 1875 berichten W. Kühne und Heidenhain über die Existenz einer Vorstufe des Trypsins. Viele neue Entdeckungen und Beobachtungen wurden danach gemacht. Pawlow entdeckte dann 1899 die Enterokinase, aber auch da war noch manches unklar, das durch E. Waldschmidt-Leitz 1923 geklärt wurde. Er widerlegte auch die vielfach herrschende Ansicht, daß die Enterokinase ein Enzym sei, u. a. Die Wirkung der Enterokinase ist ein einfacher spezifischer Aktivierungsvorgang. Es ent-

steht eine stoechiometrisch definierte, wieder trennbare Verbindung. Die Kinase ist ein thermolabiler hochmolekularer Stoff. Die Aktivierung ist keine fortlaufende Reaktion, sondern sie erreicht nach 30—60 Minuten, je nach der Reaktion des Mediums, einen Endzustand. Die Geschwindigkeit ist am größten bei neutraler Reaktion, in ungefähr 30 Minuten vollzieht sich dann diese Aktivierungsleistung. In Versuchen mit Pankreas-Lipase und -Amylase hat man festgestellt, daß die Gegenwart der Enterokinase für diese Enzyme belanglos ist. Zur Bestimmung der Kinase verhelfen die stoechiometrischen Beziehungen zwischen Enterokinase und Trypsin, man vergleicht die einer bestimmten Menge inaktiven Trypsins erteilten proteolytische Wirkung z. B. gegenüber Gelatine, während man mittels „ausgleichender Hemmung" die aktivierungshemmenden Stoffe verschiedener Drüsenpräparate zu überwinden sucht. Zum Beispiel die Gegenwart von Proteinen, wie Casein und Gelatine, wirken hemmend auf den Aktivator, dagegen ist keine Hemmung bei Abbauprodukten wie Pepton wahrzunehmen. Zur Darstellung ist zu bemerken, daß durch die Adsorption mit Tonerde bei saurer Reaktion sich die Kinase, die eine ausgeprägtere Adsorptionsaffinität besitzt als das Trypsin, leicht von diesem trennen läßt. Als Bildungsort der Kinase hatte man bisher immer die Darmschleimhaut angenommen. Waldschmidt-Leitz hält es für wahrscheinlich, daß die Kinase nur im Pankreas gebildet wird und sich in der Darmschleimhaut als sekundäres Depot findet. Man kannte zuerst nur die Spontanaktivierung. Kühne und Heidenhain machten die Entdeckung, daß ganz frisches Pankreas ein unwirksames Extrakt liefern kann, daß aber beim Altern der Drüsensubstanz regelmäßig ein wirksames Extrakt gewonnen wird. Man führte dieses auf Einwirkung von den Bakterien oder von in der Drüse vorhandenen Kalksalzen, und auch mit der Annahme einer enzymatischen Umwandlung des Trypsins aus einer Zymogenform zurück. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck berichten 1925 ebenfalls über die spontane Aktivierung, nachdem durch eine Untersuchung schon festgestellt war, daß es sich hierbei um die Bildung eines Aktivators aus der Drüsensubstanz handelt, der in seinem Verhalten mit der Enterokinase weitgehend übereinstimmt. Es war nämlich gelungen, spontan aktivierten Trypsin auf dieselbe Weise, wie es bei der Verbindung von Trypsin und Enterokinase durchgeführt war, durch Adsorptionen mittels Tonerde einen Teil des Aktivators zu entziehen und es wiederum in inaktiver Form zu erhalten, während der Aktivator in der Elution der Tonerdeadsorbate nachweisbar war. Die Bildung eines Trypsinaktivators hat als spezifisch für die Pankreasdrüse zu gelten. Die Bestimmung des Leistungsvermögens an der trypsinfreien Lösung des Aktivators hat zu dem Ergebnis geführt, daß seine Leistung mit der der Enterokinase aus Darmschleimhaut, und zwar unter den für diese optimalen Bedingungen, hinsichtlich der erreichbaren Höchstaktivierung übereinstimmt; er

ist also identisch mit der Enterokinase. E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck berichten über die spontane Aktivierung und Tonerdeadsorption: „Die Selbstaktivierung, die in der Ausgangslösung beobachtet wird, bleibt, wie aus Tabelle 1 ersichtlich, in der von Erepsin befreiten Adsorptionsmutterlauge aus, während die Mischung aliquoter Teile dieser Enzymlösung und der aus dem Adsorbate gewonnenen Elution wiederum die ursprüngliche Erscheinung spontaner Aktivierung ergibt. Die in der Tabelle verglichenen Lösungen entstammen zwei Versuchen: Nr. 1 und 2 enthielten in der Analysenprobe 1,32 bzw. 0,81, Nr. 3 1,56 T-(e). Der Glyzeringehalt der Lösungen war vergleichbar, er betrug 10%; auch brachte man die bei Zimmertemperatur und unter Toluol aufbewahrten Lösungen auf den gleichen Salzgehalt, sie entsprachen nämlich 0,01 n-Ammonazetat.

Tabelle 1.

(Angaben bedeuten die Wirkung aliquoter Teile in ccm 0,2 n - KOH.)

Nr.	Enzymlösung	Beobachtete Wirkung nach 0	2	3 Tagen
1	Glyzerinausz. verd. . . .	0,03	0,19	0,27
2	Adsorptionsrestlösung . . .	0,00	0,02	0,01
3	Adsorptionsrestlösung + Elution . . .	0,02	—	0,41

Mit dieser Erscheinung, daß das Trypsin in den Mutterlaugen der Tonerdeadsorption keine Selbstaktivierung mehr erleidet, hängt zusammen, daß man in ihnen das Enzym viel beständiger findet als in den ursprünglichen Extrakten, obgleich es reiner ist. Die Haltbarkeit des nichtaktivierten Trypsins ist viel größer als die seiner Verbindung mit Enterokinase. So findet man, wie aus Tabelle 2 hervorgeht, den Enzymgehalt der Adsorptionsrestlösung fast unverändert, in manchen Fällen war sogar nach Wochen keine Aktivitätsabnahme nachweisbar; die ursprünglichen Auszüge dagegen, in denen die Aktivierung des Enzyms beginnt, weisen schon nach kurzem beträchtliche Enzymeinbußen auf; in dem Maße, wie die Kinasebildung sich vollzieht, setzt die Zerstörung des tryptischen Enzyms ein. Nr. 1 und 2 der Tabelle vergleichen die Beständigkeit des Enzyms in den schon in Tabelle 1 angeführten Lösungen bei Zimmertemperatur, Nr. 3 gibt zum Vergleiche die Veränderung des Enzymgehaltes einer Adsorptionsmutterlauge von anderer Darstellung bei 0 ° und der höheren Glyzerinkonzentration von 50% wieder.

Tabelle 2.

Beständigkeit des Trypsins und Tonerdeadsorption.

(Angaben beziehen sich auf aliquote Teile der Lösungen.)

Nr.	Enzymlösung	Acid-Zuw. (ccm 0,2-n-KOH.) nach Tagen 0	1	2	3	Enzymgehalt T-(e) nach Tagen 0	1	2	3
1	Glyzerinextrakt verdünnt	0,53	—	0,27	0,11	0,44	—	0,18	0,07
2	Adsorptionsrest-lösg. daraus	0,39	—	0,37	0,34	0,26	—	0,24	0,22
3	Adsorptionsrest-lösg. anderer Darst.	0,44	0,43	0,44	—	0,30	0,29	0,30	— "

Die Bildung des Aktivators für die spontane Aktivierung geschieht unabhängig von der Anwesenheit des Trypsins. Waldschmidt-Leitz und I. Waldschmidt-Graser haben beobachtet, daß bei der Isolierung eines Dünndarmabschnitts das Sekret immer reichlich Erepsin enthält, aber es weist nicht nur kein Trypsin, sondern auch keine Enterokinase auf. Es ist daraus zu schließen, daß die Enterokinase des Darms in einer Vorstufe vom Pankreas geliefert wird. In den Drüsenzellen der Darmschleimhaut, in der die Aktivatorstufe angehäuft ist, geschieht dann die Umwandlung in das endgültige Produkt. Bei Entfernung des Pankreas ist schon nach kurzer Zeit der Kinasegehalt in der Darmschleimhaut ganz geringfügig. Die Angaben der Literatur widersprechen sich über Vorkommen und Bildung der Enterokinase in isolierten Darmabschnitten, W. Sawitsch und Foà geben an, keine Enterokinase im Darm, der vom Pankreas isoliert ist, zu finden. E. Pozerski und S. Krongold nehmen die Enterokinasewirkung wahr, im Gegensatz zur enzymatischen Wirkung. Waldschmidt-Leitz und Waldschmidt-Graser meinen hierzu: „Den ausgeführten Beobachtungen liegen in keinem Falle exakte Aktivitätsmessungen an spezifischen Substraten zugrunde; sie bedurften der Nachprüfung mit verbesserter Methodik. Es hat sich ergeben, wie die in der nachfolgenden Tabelle mitgeteilten Belege erweisen, daß im Sekrete Vellascher Darmschlingen auch nach monatelanger Isolierung derselben vom übrigen Darm und vom Pankreas stets reichliche Mengen von Darmerepsin nachzuweisen sind, dessen Sekretion nach der Einführung alkalischer Lösungen in das Darmlumen im Vergleich mit sauren Lösungen beträchtlich verstärkt ist. Dagegen war in keinem der untersuchten Beispiele in normalem reinen Darmsekrete die Gegenwart von Pepsin oder von Enterokinase zu beobachten.

Tabelle:

Enzymgehalt im normalen Darmsekret aus Vellaschlinge vom Hund.

(Injizierte Lösungen enthalten 0,9% NaCL: Gehalt an Enterokinase bestimmt durch Einwirkung auf 0,10 ccm in aktivem Glyzerinauszug [1:10] aus Schweinetrockenpankreas, enthaltend 0,70 T.-[e] ausgedrückt durch die Anzahl vollaktivierter T.-[e]; Bestimmungen

ausgeführt sogleich nach Gewinnung des Sekrets, Gehalte beziehen sich auf die Gesamtmenge des Sekrets.)

Datum 1926	Injizierte Lösg.	ccm	gew. Sekr. ccm	Trypsin-Geh. ang. ccm	T.-(e)	Erepsin-Geh. ang. ccm	Er.-E.	Kinase-Geh. ang. ccm	entspr. T.-(e)
30. X.	0,01-n HCL	40	28	2,7	0	5,0	0,0013	0,5	0
4. XI.	0,01-n HCL	88	70	2,5	0	5,0	0,0060	1,0	0
30. X.	1% $NaHCO_3$	50	40	2,5	0	5,0	0,023	1,0	0
11. XI.	1% $NaHCO_3$	90	95	2,5	0	5,0	0,022	1,0	0
25. XI.	1% $NaHCO_3$	85	65	—	0	5,0	0,022	1,0	0
11. XI.	0,9% NaCL	88	30	2,5	0	5,0	0,00084	1,0	0

Es ist daraus zu folgern, daß nur das Erepsin, nicht aber die Enterokinase als ursprüngliches Sekretionsprodukt der Darmschleimhaut zu gelten hat; der Aktivator scheint vielmehr von den Zellen der Darmschleimhaut dem pankreatischen Sekrete entnommen zu werden, mit welcher er in Form einer Vorstufe von der Pankreasdrüse abgesondert wird. Dieser Vorstellung entspricht die vergleichende Bestimmung des Kinasegehaltes pankreasloser Tiere im Darm, die wir in folgender Tabelle beschreiben und die erkennen läßt, daß nach der Entfernung der Pankreasdrüse die Menge des Aktivators, die in der Darmschleimhaut nachzuweisen ist, auf einen geringen Bruchteil zurückgeht.

Tabelle:

Enzymgehalt in frischer Darmschleimhaut.

(Schleimhaut präpariert durch Waschen mit Wasser und Abschaben; Bestimmungen ausgeführt, wie für die vorhergehende Tabelle angegeben; Angaben beziehen sich auf 1,0 g frische Schleimhaut.)

Versuchstier	Gehalt an: Trypsin T.-(e)	Erepsin Er.-E.	Kinase entspr. T.-(e)
Katze, normal	0,28	0,012	5,0
Hund, 8 Tage nach Entfernung d. Pankreasdr.	0,12	0,0045	0,14 "

Es gibt also keine Spontanaktivierung, sondern das Gewebe der Drüse selbst enthält Kinase, und daher die Aktivierung von Pankreassäften ohne jeden Zusatz.

Zur Kenntnis des Trypsins ist zuerst verschiedenes über seine Natur, seine Darstellung, über die Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration, über Bestimmung und seine Hemmungskörper zu berichten. Trypsin ist das basischeste der Pankreasfermente. Seine Darstellung und Trennung von den anderen Enzymen erfolgt nach den schon beschriebenen Adsorptionsmethoden. Der optimale p^H hängt vom Substrat und dessen physiko-chemischen Zustande ab. Z. B. ist er nach Northrop für:

Casein = 8,6
Edestin = 8,6—10,0
Hämoglobin = 8,4—9,2

nach Long für:

Fibrin = 8—8,6

nach Thomas und Seymour-Jones für:

Kollagen = 5,9

nach Waldschmidt-Leitz für:

Gelatine = 8,2—8,7.

Zur Bestimmung des Trypsins wendet man das Verfahren von R. Willstätter und H. Persiel an, das etwas später von Willstätter, Waldschmidt-Leitz, Dunaiturra und Künstner verbessert wurde. Der Sinn des Verfahrens ist folgender: Bei der Trennung des Trypsins von den begleitenden Enzymen kann sich sein Kinasegehalt ändern. Durch die ausgeprägtere Adsorptionsaffinität der Enterokinase läßt sie sich bei saurer Reaktion mittels Tonerde vom Trypsin trennen, und das kinasefreie Trypsin bleibt zurück. Da das Trypsin nun aus voll aktiviertem Zustand in unvollständig aktivierten Zustand übergegangen ist, so ist das Enzym für jede Bestimmung mit Enterokinase aufzuladen. Durch nicht genügende Ausschaltung der Hemmungskörper, die in den Präparaten enthalten waren, übertraf das Enzym der Restlösung bei der Aktivierung mit Enterokinase nach angewandter Adsorption die Menge des angewandten Enzyms, scheinbar durch die Abtrennung hemmend wirkender Stoffe. Das Verfahren ist nun verbessert worden, indem man bei der alkalimetrischen Messung die störende Ausfällung der unveränderten Gelatine durch Titration bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen verhindert. Beim Casein, das ebenfalls nur durch aktives Trypsin angegriffen wird, ist diese Schwierigkeit nicht. Die Analyse ist leichter ausführbar, da das Casein bei Zugabe von Alkohol eine leicht titrierbare Milch bildet. Darum ist die Bestimmung des Trypsins durch Casein günstig. Als Trypsineinheit, mit Casein gemessen, wird diejenige Enzymmenge bezeichnet, die eine Spaltung von 1,05 ccm 0,2n-KOH bewirkt. Ueber die Hemmungen der tryptischen Enzymwirkung geben Waldschmidt-Leitz und Harteneck folgenden Bericht: „Verschiebungen in der Wirkung auf mehrere Substrate sind auch von K. Glaeßner und A. Stauber sowie I. Wohlgemuth unter dem Einfluß gewisser hochmolekularer Proteine beobachtet worden. So fanden Glaeßner und Stauber eine starke Hemmung der Hydrolyse des Eieralbumins wie des Fibrins nach dem Zusatz von Serum, während die Wirkung auf Pepton hierbei unbeeinflußt blieb; und nach den Angaben von Wohlgemuth soll die Spaltung sowohl des Eiereiweißes wie auch die eines Dipeptids des Glycyl-tyrosins durch Serum gehemmt, die Hydrolyse von Pepton dagegen gefördert werden. Die erwähnten Befunde sind

seitens Glaeßner und Stauber mit der Annahme von 2, seitens Wohlgemuth sogar mit der Existenz dreier Proteasen gedeutet worden. Eine ungleich hemmende Wirkung gestattet indessen nicht, die Verschiedenheit enzymatischer Individuen zu erkennen; so haben die Erfahrungen von R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz und Fr. Memmen an tierischer Lipase erwiesen, daß dieselben Stoffe je nach der Reaktion der Lösung aktivierend oder hemmend die Wirkung des nämlichen Enzyms zu beeinflussen vermögen. Auch werden Sinn und Größe des sich geltend machenden Einflusses davon abhängen, ob und in welchem Maße in dem gegebenen Falle die Affinität des Enzyms zu dem zugesetzten Stoff die zu seinem Substrat übertrifft.

Tabelle:

Hemmung durch Serum und Albumin.

(1,00 ccm Auszug, 5,0 ccm 3%ige Gelatine bzw. Casein bzw. Pepton [ex album., Merck] bzw. 15,0 ccm $^1/_{25}$ mol Peptid; 30°; $^1/_2$stündige Aktivierung durch 0,10 ccm Kinaselösung.)

Angew. Substrat	pH	Dauer Min.	Ohne Zusatz nicht aktiv	Ohne Zusatz aktiv	m. 10 mg Alb. nicht aktiv	m. 10 mg Alb. aktiv	mit 1,0 ccm Serum nicht aktiv	mit 1,0 ccm Serum aktiv
Gelatine . .	8,7	60	0,00	0,84	—	0,25	—	0,57
Casein . .	8,7	60	0,59	1,50	0,40	1,32	0,15	1,23
Pepton . .	ca. 6	60	0,28	—	—	—	0,10	—
Pepton . . .	8,7	45	0,45	—	—	—	0,28	—
Leucyl-glycin	7,8	120	1,23	—	—	—	0,75	—
Glycyl-glycin	7,8	120	0,59	—	—	—	—	—

Man verglich den Einfluß der Zusätze auf die Wirkung der nämlichen Menge eines Glyzerinauszuges aus roher Drüse gegenüber Gelatine, wie gegenüber Pepton und einfachen Peptiden; die Angaben der Tabelle bedeuten den Aziditätszuwachs in ccm 0,2 n-KOH." — W. Graßmann, H. Dyckerhoff und O. v. Schönebeck haben in den Untersuchungen festgestellt, daß kleine Mengen von Cystein oder Pyrophosphat das Pankreastrypsin nur dann hemmen, wenn es mit Enterokinase ungenügend versehen ist. Ist dagegen das Trypsin mit einem Kinaseüberschuß versehen, so macht selbst eine größere Cysteinmenge nichts auf die Aktivität des Enzyms aus. Cystein und Kinase sind also Antagonisten. Das Cystin hat nun dem Cystein gegenüber auf die Aktivität des Pankreastrypsins eine entgegengesetzte Wirkung. Ist das Trypsin voll aktiviert, hat das Cystin keinen Einfluß; fehlt die Aktivierung oder ist sie unzureichend, so bewirkt ein Cystinzusatz eine erhebliche Steigerung der Aktivität. Man hat nun einen Körper bekannter Konstitution gefunden, der den Aktivator ersetzen kann. — Hemmend

auf Trypsin wirken noch: Blausäure und Schwefelwasserstoff. Es folgen nun Tabellen von Graßmann, Dykerhoff und v. Schönebeck:

„Tabelle:

Hemmungen des Pankreastrypsins durch Pyrophosphat in Gegenwart wechselnder Kinasemengen.

(In der Versuchsprobe von 2 ccm sind enthalten: 0,8 mg Trypsin Trockenpräparat und 60 mg Casein [Hammarsten]; p^H = 8,9, m:5— Ammoniak Ammonchloritpuffer. 20 Minuten bei 40°.)

$Na_4P_2O_7$ Mol/Liter	Kinasemenge 0,00	0,08 Hydrolyse in ccm n/20-KOH	0,12 ccm
0,000	0,32	0,82	0,81
0,002	0,22	0,78	—
0,006	0,14	—	—
0,010	0,03; 0,05	0,63	—
0,020	—	0,24	0,57; 0,54.

Tabelle:

Hemmungen des Pankreastrypsins durch Cystein in Gegenwart wechselnder Kinasemengen.

(Bedingungen wie in vorhergehender Tabelle.)

Cystein Mol/Liter	Kinasemenge 0,00	0,04 Hydrolyse in ccm n/20-KOH	0,12 ccm
		a) Trypsinpräparat 6	
0,00	0,26	0,67	0,90
0,001	—	0,15	0,86
0,002	0,00	0,15	0,87
0,004	0,05	0,16	0,91
0,010	—	0,17	0,64
0,020	0,01	0,15	0,54
		b) Trypsinpräparat 12	
0,0000	0,82; 0,80	0,02	1,20; 1,17
0,0002	0,60	0,84	—
0,0006	0,35	0,75	—
0,0010	—	0,60	1,20
0,0016	—	0,44	—
0,0020	0,31; 0,34	0,30	1,18
0,0060	0,29	—	0,79
0,0120	0,29	0,32	0,30

Tabelle:

Aktivierung des Pankreastrypsins durch Cystin in Gegenwart wechselnder Kinasemenge.

(Bedingungen wie in vorhergehender Tabelle.)

Trypsinpräparat	Cystin Mol Liter	Kinase 0,00 Hydrolyse in ccm	Kinase 0,08 ccm n/20-KOH
Restlösung, frei von Dipeptidase und Polypeptidase	0,000	0,01	1,05
	0,010	0,15; 0,13	—
Trockenpräparat 15, erepsinfrei . . .	0,000	0,21; 0,20	0,74; 0,73
	0,005	0,41; 0,42	—
	0,010	0,72; 0,76	0,76; 0,71
	0,020[1])	0,74	—
	0,040[1])	0,73	—
Trockenpräparat 10, erepsinfrei . . .	0,000	0,60	0,92
	0,005	0,81; 0,80	0,90
Trockenpräparat 9, erepsinfrei . . .	0,000	0,41	1,04
	0,005	0,71; 0,76	1,07; 1,04
Trockenpräparat 16, frei von Erepsin und Carboxy-Polypeptidase . . .	0,000	0,01	0,43
	0,010	0,43	— "

Es soll außerdem noch Antifermente geben, z. B. die Antiprotease: Antitrypsin. Ueber die Art der Wirkung und über Sonstiges ist noch nichts Bestimmtes festgelegt.

Das Trypsin ist ein Gemisch mehrerer Gruppen von Fermenten. Die frühere Auffassung eines einheitlichen Trypsins, das die Eiweißkörper zunächst bis zu den Polypeptiden spaltet und dann noch die Polypeptide bis zu freien Aminosäuren auflöst, ist nicht mehr gültig. Das nicht aktivierte Trypsin spaltet die Protamine, das Pepsin nicht. Diese Tatsache läßt auf einen einfacheren strukturellen Bau schließen. Kossel nimmt an, daß alle Proteine einen protaminartigen Kern haben. Für das mit Enterokinase aktivierte Trypsin ist die Benennung Trypsin-Kinase angewendet worden. Sie entspricht der Bedeutung der Enterokinase als eines Hilfsstoffs für die Auslösung bestimmter enzymatischer Funktionen; das Gegenstück ist die Gegenüberstellung des pflanzlichen Enzyms Papain mit seiner Blausäureverbindung (nach R. Willstätter und W. Graßmann).

Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner und W. Graßmann geben im folgenden eine aufschlußreiche Tabelle:

„Tabelle:

Hydrolyse durch Trypsin, Trypsinkinase, Erepsin: Reihenfolge und Leistung.

(Hydrolyse von 0,20 g Clupeinsulfat = 0,142 g wasser- und aschefreies Clupein, Leistungseinheit angenommen entsprechend 0,90 ccm 0,2n-COOH.)

[1]) Cystin nicht vollständig gelöst.

Vrs. Nr.	Reihenfolge d. Enzyme	Zuwachs (ccm 0,2n) COOH	NH_2	Leistung	Leistungs-Verhältnis
1	Trypsin	0,90	0,90	1,0+0,03	1
	Trypsin-Kinase	2,67	2,36	3,0+0,04	3
	Darmerepsin	0,94	0,96	1,0+0,05	1
	Summe:	4,51	4,22	5,0	
2	Trypsin	0,92	0,92	1,0+0,03	1
	Darmerepsin	0,93	0,98	1,0+0,03	1
	Trypsin-Kinase	0,89	0,83	1,0+0,04	1
	Darmerepsin	1,70	1,58	1,9+0,07	2
	Summe:	4,44	4,31	4,9	
3	Trypsin-Kinase	3,13	3,15	3,5+0,03	2
	Darmerepsin	1,53	1,72	1,7+0,04	1
	Summe:	4,66	4,87	5,2	
4	Trypsin	0,92	0,96	1,0+0,03	
	Hefeerepsin	0,08	0,12	0	

Bemerkenswerte und neuartige Aussagen erlaubt die Tabelle hinsichtlich der spezifischen Funktionen der einzelnen enzymatischen Individuen. Die Feststellung zwar, daß das Trypsin, das nichtaktivierte Enzym, in Bestätigung der Angaben von E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck die Anspaltung des Clupeinmoleküls vollzieht, und daß seine Funktion nach dem Zutritt der Enterokinase beträchtliche Erweiterung erfährt, war zu erwarten; die Beobachtung aber ist überraschend, daß die hydrolytische Leistung des vollaktivierten Enzyms „Trypsin-Kinase" am Clupein, wie der Vergleich der Versuche 1 und 3 erkennen läßt, in ihrem Ausmaße hinter der Anzahl der bei kombinierter Einwirkung von Trypsin und Trypsin-Kinase lösbaren Bindungen zurückbleibt. Die funktionelle Ungleichwertigkeit der Systeme Trypsin + Trypsin-Kinase einerseits und Trypsin-Kinase anderseits, die sich hieraus ergibt, besagt also, daß die Dissoziation des Systems Trypsin-Kinase, die beispielsweise die adsorptive Trennung seiner Komponenten ermöglicht, nicht ausreicht, um der spezifischen Funktion des Trypsins neben der seiner Aktivatorverbindung Geltung zu verschaffen. Eine weitere Beziehung wird durch den Vergleich der Versuche 1 und 3 erkennbar: Die hydrolytische Wirkung des Trypsins, die man an Clupein beobachtet, addiert sich bei der alleinigen Aufspaltung des Moleküls durch Trypsin-Kinase und Darmerepsin zu ähnlichen Anteilen zu der Wirkung dieser beiden Enzyme; es wäre zu prüfen, ob es gelingt, durch eine noch stärkere Zurückdrängung der Dissoziation im System Trypsin-Kinase, nämlich durch eine Steigerung des Kinaseüberschusses, den auf die Erepsinwirkung entfallenden Anteil noch zu erhöhen. Wenn die Zuteilung der spezifischen Funktionen des Trypsins zur Wirkung anderer Enzyme, nämlich Trypsin-Kinase und Erepsin, durch diese Beispiele belegt wird, so ist es

auf der anderen Seite gelungen, den größeren Wirkungsbereich des Systems Trypsin-Kinase, nämlich seine Leistung an zweiter Stelle nach derjenigen des Trypsins (Versuch 1) mit $^4/_5$ des hydrolytischen Gesamtvorgangs, durch eine Veränderung in der Reihenfolge der angewandten Enzyme weiter zu zerlegen; durch die vorausgehende Einwirkung von Darmerepsin, die Versuch 2 wiedergibt, wird nämlich erreicht, daß die gesamte, für Trypsin-Kinase noch gemessene Leistung sich auf $^1/_5$ beschränkt, während die restlichen Anteile der tryptischen Leistung, $^2/_5$ der Gesamthydrolyse, nunmehr sich der ereptischen Wirkung hinzugesellen. Die durch erschöpfende Einwirkung des Trypsins gewonnenen Spaltprodukte aus Clupein, die durch das Darmerepsin rasch und in charakteristischem Ausmaße zerlegt werden, erweisen sich, wie aus Versuch 4 der Tabelle ersichtlich, gegenüber dem Hefeenzym als beständig. Es ist bemerkenswert, daß in diesem Beispiel die spezifische Einstellung der beiden Peptidasen strenger hervortritt als die funktionellen Unterschiede, die zwischen Darmerepsin und Trypsin-Kinase beobachtet werden. (Vgl. die Versuche 1 und 2 der Tabelle.)"

Die Enzyme: Trypsin, Trypsin-Kinase und Erepsin können sich nach vorausgehendem in ihren Wirkungen in gewissem Umfange, die sich auf die Auflösung bestimmter chemischer Bindungen im Laufe der Gesamthydrolyse beziehen, vertreten. Trotzdem hat jedes Enzym seinen abgegrenzten Wirkungskreis. Die spezifische Einstellung der einzelnen Proteasen bezieht sich auf die Aufspaltung verschiedener chemischer Bindungen. Ein Unterschied zwischen Erepsin und Trypsin ist erwiesen an den einfachen Peptiden, die nur durch Erepsin gespalten werden. Die Wirkung des Trypsins besteht ausschließlich in der Freilegung von Peptiden, also in der Zerlegung des Moleküls in größere Bruchstücke, zum Unterschied von der der Trypsin-Kinase und des Erepsins, die eine Menge freier Aminosäuren zur Folge hat. Ein Gemisch tryptischer und ereptischer Enzyme ist in den Sekreten und Auszügen der Pankreasdrüse enthalten. Die chemische Natur des Adsorbens und die Wasserstoffzahl, bei der die Adsorption erfolgt, ist für die Trennung der proteolytischen Enzyme aus einem Gemisch wichtig. In ihren Angriffen auf die Substrate unterscheiden sie sich folgendermaßen: die ereptischen Enzyme lagern sich an die basische, die Aminogruppe an, die tryptischen an die elektronegative, die Carboxylgruppe der Substrate. Der Unterschied in ihrer Adsorptionsspezifität ist der: die ereptischen haben die stärker sauren Eigenschaften, bei saurer Reaktion, sie werden von basischen Adsorbentien, wie dem Tonerde-Gel $Al(OH)_3$ auswählend aufgenommen. Das Pankreastrypsin hat eine proteinspaltende und polypeptidspaltende Komponente, eine Proteinase und eine Polypeptidase. Die tryptische Polypeptidase heißt zum Unterschied gegen die ereptische Amino-Polypeptidase: Carboxy-Polypeptidase. Die Auflösung des enzymatischen Gemisches vollzieht sich bei neutraler

Reaktion mittels des Tonerde-Adsorbens C_γ. Die Polypeptidase wird vorwiegend adsorbiert. In saurem Milieu werden beide Enzyme in gleichem geringen Maße aufgenommen. Im folgenden ein Schema von E. Waldschmidt-Leitz und A. Purr: Schema über die adsorptive Abscheidung der 4 einzelnen proteolytischen Enzyme aus Darm und Pankreas:

„Proteinase, Carboxy-Polypeptidase, Amino-Polypeptidase, Dipeptidase + Tonerde C_γ bei $p^H = 4$.

Adsorptions-Restlösung:	Elution:
Proteinase, Carboxy-Polypeptidase + Tonerde C_γ bei $p^H = 7$ Adsorptions-Restlösung: Proteinase. Elution: Carboxy-Polypeptidase.	Amino-Polypeptidase, Dipeptidase + Eisenhydroxyd bei $p^H = 4$ Adsorptions-Restlösung: Amino-Polypeptidase. Elution: Dipeptidase. "

Die Proteinase wie die Carboxy-Polypeptidase erfahren durch die Enterokinase eine spezifische Aktivierung. Aber die Carboxy-Polypeptidase spaltet auch ohne Aktivierung eine Anzahl Substrate im Gegensatz zur Proteinase. Die Carboxy-Polypeptidase deckt sich mit dem bisher beschriebenen nicht aktivierten Pankreastrypsin. Der Wirkungsbereich wird aber erweitert durch den Aktivator. Zur Bestimmung der Carboxy-Polypeptidase berichtet Waldschmidt-Leitz und A. Purr: „Das Verfahren zur Bestimmung der Carboxy-Polypeptidase, das wir anwenden, gründet sich auf die zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit bestehenden Beziehungen, und es bezieht sich auf die Messung des maximal durch Enterokinase aktivierten Enzyms; man bewirkt seine Aktivierung wie die Proteinase aus Pankreas durch ½stündige Einwirkung überschüssiger Kinase bei 30°. Als Maß für die Menge des Enzyms dient die Carboxy-Polypeptidase-Einheit (C.-Pol.-E.), nämlich das Tausendfache derjenigen Enzymmenge, für welche sich die Konstante der monomolekularen Reaktion zu 0,01 ergibt. Die Reaktions-Konstante ergibt also zugleich die Anzahl Enzymeinheiten in der Bestimmungsprobe. p^H-Abhängigkeit: die Wirkung der Carboxy-Polypeptidase messen wir an einem spezifischen Substrate, Chloracetyl-l-tyrosin, und zwar in der Aufladung des Enzyms mit Entero-Kinase. Das Wirkungsoptimum des aktivierten Enzyms liegt für das angewandte Substrat, wie aus der nachfolgenden Tabelle hervorgeht, zwischen $p^H = 6{,}9$ und $p^H = 7{,}4$, also bei nahezu neutraler Reaktion. Die Hydrolyse des Substrats verfolgen wir durch Ermittlung des Zuwachses freier NH_2-Gruppen nach van Slyke[1]); zuweilen ist es infolge der Abscheidung des bei der Spaltung gebildeten, schwerlöslichen Tyrosins erforderlich, vor

[1]) Das gasometrische Verfahren, das auf der Bestimmung des Aminostickstoffs mit salpetriger Säure beruht.

der Einwirkung der salpetrigen Säure durch Zusatz verdünnter Lauge eine vollkommene Lösung des Reaktionsgemisches zu bewirken.

Tabelle:

Chloracetyl-l-Tyrosin-Spaltung und Wasserstoffzahl.

(0,0515 g Substrat (0,0002 Mol); 0,25 ccm gereinigte Enzymlösung, mit Enterokinase aktiviert; 2,00 ccm $^1/_{15}$ mol Phosphatpuffer; Gesamtvolumen 7,0 ccm; 45 Minuten, 30°.)

p^H	NH_2-Zuwachs ccm 0,05-n	Spaltung %
5,6	0,31	8
6,2	0,80	20
6,6	0,96	24
6,9	1,03	28
7,4	1,12	31
7,7	0,63	16
8,0	0,55	14
8,5	0,51	13
9,0	0,31	8

Adsorptionsverhalten von Proteinase und Carboxy-Polypeptidase.

(60 ccm Enzymlösung durch 3malige Adsorption mit Tonerde Cγ (= je 62,5 mg Al_2O_3) bei p^H = 3,8 von ereptischen Enzymen befreit [enthalten 30,0 T- (e) neben 0,48 C.-Pol.-E]; p^H der Adsorption eingestellt mit verdünnter Natronlauge bzw. Essigsäure; Bestimmungen ausgeführt an den in der Zentrifuge abgetrennten Adsorptionsmutterlaugen; Messung der Proteinase nach dem früher beschriebenen Verfahren mit Casein als Substrat.)

Tabelle:

Angew. Adsorbens	Anzahl d. Adsorpt.	Angew. mg. Oxyd	p^H der Adsorp.	Adsorbiert % Proteinase	Carboxyp.
Tonerdesorte A	3	je 80	7,0	50	37
„ B	3	je 103	7,0	22	26
„ Cγ	3	je 62,5	7,0	20	90
Ferrihydroxyd	3	je 49	7,0	50	67
„	2	je 49°	3,8	20	18
Beryllium hydroxyd	3	je 14,4	7,0	0	10 ”

Zur Spezifität von Carboxy-Polypeptidase und Proteinase sind folgende Tabellen gegeben.

„Tabelle:

Spezifität von Proteinase und Carboxy-Polypeptidase aus Pankreas.
(Angaben bedeuten: — = negative, + = positive, + + = verstärkte Hydrolyse.)

Substrat	Proteinase aktiv.-frei	aktiviert	Carboxy-Polypeptidase aktiv.-frei	aktiviert
Casein	—	+	—	—
Histon	—	+	—	—
Clupein	—	+	+	++
Leucyl-glycin-tyrosin	—	—	+	++
Leucyl-glycyl-glycin	—	—	—	—
Chloracetyl-tyrosin	—	—	+	++
Chloracetyl-leucin	—	—	+	+
Phthalyl-glycyl-glycin	—	—	+	++

Tabelle:

Spezifität der Carboxy-Polypeptidase (aktiviert).

(Proteinasefreie Enzymlösung, mit überschüssiger Enterokinase aktiviert; $p^{II} = 7{,}4$, 30°; Angaben beziehen sich auf die Analysenproben von 5,0 ccm.)

Substrat	Angew. mg	Angew. C.-Pol.-E.	Zeit Stunden	Acid-Zuw. ccm 0,05-n
Casein	300	0,0018	3	0,00
Thymus-histon	100	0,0037	1,5	0,00
Clupein	100	0,0037	2	1,75
d,l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin	35,1	0,0029	1	1,10
Chloracetyl-l-tyrosin	51,5	0,0029	1	1,32
Chloracetyl-l-leucyn	42,5	0,0029	2	0,77
Phthalyl-glycyl-glycin	26,2	0,0018	1	0,40

Tabelle:

Spezifität der Proteinase.

(Proteinaselösung, frei von Carboxy-Polypeptidase und von Enterokinase; zur Aktivierung mit überschüssiger Enterokinase behandelt; $p^{II} = 8{,}4$ 30°. Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 5,0 ccm.)

Substrat	Angew. mg	Angew. T.-(e)	Zeit Stdn.	Aciditäts-Zuwachs (ccm 0,05-n) aktiv.-frei	aktiviert
Casein	300	1,0	0,33	0,00	1,05
Thymus-histon	100	0,4	2	0,01	0,62
Clupein	100	0,4	2	0,00	2,90
d,l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin	35,1	0,5	2	0,00	0,00
Chloracetyl-l-tyrosin	51,5	1,0	12	0,00	0,05
Chloracetyl-l-leucyn	41,5	1,0	6	0,00	0,00
Phthalyl-glycyl-glycin	26,2	0,5	2	0,00	0,00 ”

Von der Carboxy-Polypeptidase läßt sich ein Enzym, das spezifisch für Protamine ist, abtrennen. Das Enzym, die Protaminase, hat dasselbe Adsorptionsverhalten wie die Proteinase aus Pankreas. Das Verfahren zur Reinigung der Pankreas-Proteinase wendet man daher auch hier an. In den mit Tonerde (bei saurer

Reaktion) von den Carboxy-Polypeptidasen befreiten Adsorptionsmutterlaugen ist dann die Proteinase und Protaminase. Man kann aber leicht die Wirkung der tryptischen Proteinase ausschalten. Man läßt auf die frisch gewonnenen kinasefreien Pankreasauszüge wegen der geringen Anteile von spontan aktivierter Proteinase einen Zusatz von Eieralbumin wirken. Die spontan aktivierte Proteinase wird dadurch inaktiviert. Die Wirkung der Protaminase wird durch Albumin nicht gehemmt. Darüber eine Tabelle von Waldschmidt-Leitz und Mitarbeitern:

Tabelle:

„Hemmung der Proteinase durch Albumin.

(Enzymlösung [angew. 3,0 ccm]; Angaben bedeuten den Zuwachs an ccm 0,2n-COOH bzw. NH_2.)

Zugesetzt Eieralbumin (Kahlbaum) mg	Wirkung auf Kasein (0,30 g 8 Stunden)	Clupeinsulfat (0.20 g 1 Stunde)
0	0,35	0,40
4	0,02	0,40 "

Man nützt die Affinität der Proteinase zu genuinen Eiweißkörpern. Aus dem peptidasenfreien Gemisch der beiden Enzyme wird die Proteinase durch Eieralbumin gehemmt und mit Zusatz von Aceton gefällt. Dadurch wird der aktivierte und auch der nicht aktivierte Teil der Proteinase abgetrennt. Die Wirkung der Protaminase ist ähnlich der der tryptischen Enzyme: Proteinase und Carboxy-Polypeptidase, die der Aktivierung durch Enterokinase bedürfen. Ihr Angriff vollzieht sich ebenfalls am Carboxylende der Substrate. Es hat sich gezeigt, daß auf die Wirkung der Protaminase, die Enterokinase keinen Einfluß ausübt, und daß eine Aktivierung der Protaminase bereits erfolgt sei in den Drüsenauszügen, wird nicht angenommen. Waldschmidt-Leitz und E. Kofranyi bringen folgende Tabelle:

„Abtrennung der Peptidasen. 30 ccm Glyzerinauszug aus Pankreas (1:10), mit 30 ccm Wasser verdünnt und mit 5,0 ccm n-Acetatpuffer (p^H-3,8) versetzt, unterwarf man fünfmal der Adsorption mit je 5,0 ccm Tonerde C_γ (je 100 mg Al_2O_3); die in der Zentrifuge abgetrennte und mit 0,1 n-NaOH neutralisierte Adsorptionsrestlösung behandelte man weiterhin achtmal mit je 5,0 ccm derselben Tonerde (erhalten 120 ccm peptidasefreie Lösung 1). — 32 ccm der peptidasefreien Lösung 1 wurden mit 8 ccm 5%igen Eieralbumin eine Stunde bei 30° belassen, darauf durch Zusatz von 24 ccm Aceton gefällt. Aus der in der Zentrifuge abgetrennten Mutterlauge der Fällung vertrieb man das Aceton durch Hindurchleiten von Luft

(bei Zimmertemperatur) bis zum Verschwinden des Geruches (erh. 35 ccm proteinasefr. Lösung 2).

Tabelle:

	Geprüfte Lösung	Angew. in ccm	Zeit i. Min.	Spaltung in ccm, 0,05 n
Protaminase	Auszug	0,50	60	0,75
	Lösung 1	2,00	60	0,60
	Lösung 2	2,00	60	0,56
Proteinase	Auszug	0,10	20	4,80
	Lösung 1	1,00	1020	6,00
	Lösung 2	2,00	1020	0,12
Carboxy-Polypeptidase	Auszug	0,50	60	2,80
	Lösung 1	2,00	1020	0
Amino-Polypeptidase	Auszug	0,20	30	2,00
	Lösung 1	2,00	1020	0,08
Dipeptidase	Auszug	0,50	60	1,80
	Lösung 1	2,00	1020	0

Die Bestimmung der Protaminase erfolgte mit Clupeon (Säureproton aus Clupein) nach A. Kossel als Substrat (angew. 0,08 g [Sulfat] 60 Minuten, $p^H = 8{,}0$). Die verzeichneten Angaben über die Wirkung bedeuten Zuwachs in ccm 0,05 n-NH_2 (nach van Slyke)." Die optimale Wasserstoffzahl der Protaminasewirkung gegenüber Clupein entspricht schwach alkalischer Reaktion $p^H = 8{,}0$. Das Enzym ist also nach der p^H-Abhängigkeit seiner Wirkung mit den tryptischen Enzymen verwandt. Es folgen 2 Tabellen über Wirkung und Spezifität der Protaminase:

„Tabelle:

Protaminasewirkung auf Clupein und Wasserstoffzahl.

(0,20 g Clupeinsulfat in 5,0 ccm H_2O gelöst; 3,0 ccm Enzymlösung; Proteinase durch Zusatz von 4 mg Eieralbumin ausgeschaltet; p^H eingestellt mit 0,1 n-NaOH; 1 Stunde, 30°.)

p^H	7,0	7,4	7,7	8,0	8,3	8,5
NH_2-Zuwachs (ccm 0,2 n)	0,25	0,40	0,50	0,60	0,55	0,25

Die Spezifität der Protaminase.

(Hydrolyse der Substrate [bei 30°] jeweils bis zum Stillstande der enzymatischen Einwirkung durchgeführt, welcher durch die Wirkungslosigkeit weiterer Enzymzugabe kontrolliert war; Aktivität der Protaminase gemessen an der Einwirkung auf 0,20 g Clupeinsulfat während einer Stunde.)

Tabelle:

Nr.	Substrat	Angew. mg	Enth. mg N.	Enzym-lösg. ccm	Akt. entspr. ccm 0,2-n	Zeit Stdn.	Zuw. ccm 0,2-n-NH_2
1	Clupeinsulfat	200	42	3,0	0,40	3	0,62
2	Salminsulfat	200	44	3,0	0,50	3	0,50
3	Scombrinsulfat	200	38	3,0	0,60	5	0,46
4	Rohclupein leicht lös. Form	225	42	3,0	0,44	5	0,64
5	Clupeinester	200	—	3,0	0,44	4	0,01
6	Salminester	200	—	3,0	0,44	4	0,04
7	Benzyliden-clupein	200	—	3,0	0,44	4	0,60
8	Clupeon nach Kossel	200	44	3,0	0,36	6	1,01
9	Histo-pepton	125	19	3,0	0,44	5	0,20
10	Pepton ex alb.	200	—	3,0	0,36	4	0,01
11	Hexa-glycin	75	—	2,0	0,36	5	0,00
12	Leucyl-glycin-tyrosin	50	—	2,0	0,36	5	0,13[1])
13	Phenyl-alanyl-arginin	22	—	2,0	0,36	5	0,03
14	Leucyl-glycin-anhydrid	50	—	2,0	0,36	5	0,01

Nach den Angaben der Tabelle ist die Protaminasewirkung auf die Hydrolyse basischer Substrate von mittlerer Molekulargröße beschränkt (Nr. 1—4, 8 und 9); ein argininhaltiges Dipeptid, Phenyl-alanyl-arginin, wird nicht angegriffen (Nr. 13). Die beobachtete geringfügige Spaltung des basenfreien Tripeptids Leucyl-glycyl-tyrosin (Nr. 12) dürfte kaum auf die Protaminase selbst, eher auf die Wirkung von Spuren beigemengter Polypeptidase gegenüber diesem besonders leicht spaltbaren Substrate zurückzuführen sein." — Drei Teilfermente des Trypsins sind nun festgestellt.

Das Erepsin hat ebenfalls seine Teilfermente. — Ueber seine Darstellung und seine Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration ist schon im vorhergehenden berichtet worden. Die Bestimmung wird ausgeführt bei der für seine Wirkung günstigsten Wasserstoffzahl von $p^H = 7{,}8$ durch die Einwirkung des Enzyms auf ein Dipeptid, Glycyl-glycin, dessen Hydrolyse man durch die alkalimetrische Messung der freigelegten Carboxyle in 85%iger methylalkoholischer Lösung verfolgt. — Beim Erepsin werden zwei Enzyme unterschieden: Eine Aminopolypeptidase und eine Dipeptidase. Diese Erkennung beruht auf der Trennung der Dipeptidase und Polypeptidase; die Dipeptidase wird auswählend bei saurer Reaktion mittels eines basischen Adsorbens, dem Ferrihydroxyd adsorbiert.

Auch ist die Dipeptidase von der Polypeptidase durch ihre geringere Beständigkeit zu unterscheiden. Ueber die Adsorption der Peptidasen nun 2 Tabellen von Waldschmidt-Leitz, Balls, Waldschmidt-Graser:

[1]) Hydrolyse unvollständig (entsprechend 38% einer Peptidbindung).

„Tabelle:

Tonerdeadsorption und Mengenverhältnis der Peptidasen.

(Erste Adsorption: 100 ccm Glyzerinauszug aus Darmschleimhaut, durch Fällung mit Essigsäure gereinigt, adsorbiert mit 7,5 ccm Tonerdesuspension C_γ [= 174,0 mg Al_2O_3] bei p^H = 5, Adsorbat nach zweimaligem Waschen mit je 100 ccm 20%igem Glyzerin eluiert mittels 50 ccm 0,1-mol Na_2HPO_4 [20% Glyzerin enthaltend], Elution mit Essigsäure neutralisiert; 2. Adsorption: 25 ccm Tonerdeelution, mit n-HCl angesäuert [p^H = 5,0]; adsorbiert mit 3,75 ccm Tonerdesuspension [= 87,0 mg Al_2O_3], Adsorbat nach dem Waschen wie oben eluiert, mit 25 ccm 0,1-mol NH_2HPO_4, Elution neutralisiert; Angaben beziehen sich auf aliquote Teile der Lösungen.)

Enzymlösung Rohauszug mit Essigsäure	Gehalt der Analysenprobe an Er.-E.	Pol.-(e)	Mengenverhältnis der Enzyme
vorgereinigt	0,00228	0,00394	1 : 1,7
Elution des 1. Adsorbats	0,00143	0,00205	1 : 1,4
Elution des 2. Adsorbats	0,00091	0,00200	1 : 2,2

Tabelle:

Adsorption mit Eisenhydroxyd und Mengenverhältnis der Peptidasen.

(80 ccm Glyzerinauszug, durch Fällung mit Essigsäure gereinigt, nach Zusatz von 3,0 ccm n-Acetatpuffer von p^H = 3,8 [p^H der Lösung = 4,0] mit 10,0 ccm Eisenhydroxydsuspension [= 327,6 mg Fe_2O_3] adsorbiert: 80 ccm erste Adsorptionsmutterlauge; 75 ccm von dieser mit 5,0 ccm Eisenhydroxyd [= 163,8 mg Fe_2O_3] adsorbiert: zweite Adsorptionsmutterlauge; 75 ccm von dieser erneut mit 4,0 ccm Adsorbens [= 131,0 mg Fe_2O_3] behandelt: 65 ccm dritte Adsorptionsmutterlauge; Operationen ausgeführt unter Eiskühlung; Angaben beziehen sich auf aliquote Teile der Lösung.)

Enzymlösung Rohauszug mit Essigsäure	Gehalt der Analysenprobe an Er.-E.	Pol.-(e)	Ausbeute % an Dipeptid.-	Polypeptid.
gereinigt	0,00255	0,00280	—	—
1. Adsorptionsmutterlauge	0,00046	0,00273	18	97
2. Adsorptionsmutterlauge	0,00007	0,00150	3	54
3. Adsorptionsmutterlauge	0	0,00125	0	45 "

Zur Bestimmung der Dipeptidase und Polypeptidase folgendes: Die Wirkung des Dipeptids spaltenden Enzyms mißt man an der Spaltung von d,l-Leucyl-glycin (wie beim Pankreaserepsin beschrieben). Die Wirkung der Polypeptidase wird gemessen, bei der als optimal erkannten Wasserstoffzahl von p^H = 8, durch die Hydrolyse von d,l-Leucyl-diglycyn, nämlich von 0,01 Mol des Peptids. Waldschmidt-Leitz und Balls berichten über die Einheit, über die Spezifität der Amino-Polypeptidase und über Abbau durch Amino-Polypeptidase, Dipeptidase und Carboxy-Polypeptidase: „Als Einheit der Amino-Polypeptidase aus Darmschleimhaut (Pol.-e) bezeichnen wir daher, in Anlehnung an die für das Milzenzym gegebene Defini-

tion, das Tausendfache derjenigen Enzymmenge, für welche sich unter den Bedingungen der Bestimmung (0,245 g d,l-Leucyl-diglycyn, 0,0005 Mol. Phosphatpuffer, Volumen 10,0 ccm p^H 8,0 30°), der Quotient aus Umsatz (in ccm 0,2-n COOH) und Reaktionsdauer in Minuten zu 0,001 ergibt."

Die Spezifitätsprüfung proteolytisch einheitlicher Amino-Polypeptidase an Peptiden und Peptid-Derivaten, deren Ergebnis wir nachstehend tabellarisch wiedergeben, läßt erkennen, daß eine Hydrolyse durch das Enzym nur bei Gegenwart einer freien Aminogruppe in den Substraten erfolgt, während man eine freie Carboxylgruppe dafür entbehrlich findet: Acylierte Peptide werden nicht hydrolysiert (Nr. 7—9 der Tabelle), wohl aber Polypeptidester (Nr. 10 und 11 der Tabelle). Dies gilt indessen nicht für die Spaltbarkeit am Carboxyl substituierter oder decaboxylierter Dipeptide, welche wohl durch das Hefeenzym, nicht dagegen durch die Polypeptidase tierischer Herkunft angegriffen werden (Nr. 12—14 der Tabelle).

Tabelle:

Spezifität gegenüber Peptiden und Peptid-Derivaten.

(Enzymlösung durch wiederholte Adsorption mit gealtertem roten Eisenhydroxyd [bei p^H = 4,0] von Dipeptidase sowie von Carboxy-Polypeptidase und Proteinase befreit, p^H = 8,0, mit wenig n-NH_3 eingestellt; 30°; Angaben beziehen sich auf die zur Analyse entnommene Probe von 5,0 ccm.)

Vers. Nr.	Substrat	Ang. mg	Angew. Pol. (e)	Zeit Stdn.	Zum. (ccm 00,5-n) COOH.	NH_2	Spalt. (%) bez. a. lCONH.
1	Triglycin	95	0,004	2	4,00	—	40
2	Tetraglycin	24	0,004	24	2,91	—	149
3	Tetraglycin	24	0,006	72	3,19	—	1,62
4	Pentaglycin	25	0,004	22	—	1,14	69
5	Hexaglycin	18	0,002	17	—	0,26	25
6	d,l-Leucyl-glycyl-l-tyrosin	35	0,002	17	0,58	—	29
7	Benzoyl-d,l-Leucyl-glycin	30	0,002	17	0,00	—	0
8	Carbäthoxyl-d,l-leucyl-diglycin	31	0,002	17	0,00	—	0
9	Chloracetyl-l-tyrosin	26	0,002	17	0,00	—	0
10	d,l-Leucyl-diglycin-äthylester-chlorhydrat	25	0,012	9,5	—	0,56	35
11	d,l-Leucyl-diglycin-äthylester-chlorhydrat	25	0,012	9,5	0,70	—	43
12	Glycyl-glycin-methylester-chlorhydrat	20	0,002	21	0,00	—	0
13	Glycyl-d,l-alanin-äthylester-chlorhydrat	21	0,002	17	0,00	—	0
14	d,l-Leucyl-decarboxy-glycin	27	0,002	17	0,00	—	0

Tabelle:

Fraktionierter Abbau von d,l-Leucyl-glycyl-tyrosin[1]).

(p^H = 8,0 für die Wirkung von Aminopolypeptidase und Dipeptidase, p^H = 7,7 für die Wirkung von Carboxy-Polypeptidase; p^H eingestellt mittels Phosphatpuffers [0,00075 Mol im gesamten Versuchsansatz von 50 ccm]; 30°; Angaben beziehen sich auf die Analysenprobe von 5,0 ccm.)

Vers. Nr.	Peptid mg	Reihenfolge der Enzyme	Enzym-Einheit.	Zeit Stdn.	Acid-Zuwachs	Spalt. (%), bez. a. lCONH.
1	28,3	Amino-Polypeptidase	0,008	6	0,73	45
	28,3	„ „	0,0125	8,5	0,76	47
	28,3	Dipeptidase	0,0005	20	0,64	40
	28,3	„ „	0,0005	27	0,64	40
2	22,6	Carboxy-Polypeptidase	0,014	5,5	1,00	78
	22,6	„ „	0,014	7,5	1,00	78
	22,6	„ „	0,027	10	1,00	78
	22,6	Dipeptidase	0,0008	7	0,54	42
	22,6	„	0,0008	20	0,54	42 ”

Bei besetzter Carboxylgruppe spaltet die Aminopolypeptidase, bei besetzter Aminogruppe spaltet die Carpoxy-Polypeptidase.

Die Schule Willstätters hat ein anderes Einteilungssystem als das bisherige gebracht. Proteasen nennt man alle Enzyme, die auf dem Wege genuines Protein-Aminosäuren tätig sind. Darum heißen die Enzyme, die Eiweiß angreifen und keine Polypeptide: Proteinasen. Die anderen heißen Ereptasen. — Die Grenzen sind nicht scharf. So nimmt z. B. Abderhalden noch verschiedene Polypeptide an: eine Tyrosin- und Leucin-Polypeptidase. Wenn Tyrosin die Carboxylgruppe trägt, spaltet die Polypeptidase nicht, wohl aber wenn Leucin diese Gruppe trägt. Außerdem gibt es nach Abderhalden noch Acylasen, Fermente, die nur acilierte, und nicht freie Polypeptide, und Acyl-Derivate von bestimmter Zusammensetzung spalten. Er hat auch beobachtet, daß in einer Trypsin-Lösung Erepsin auftauchte auf Zusatz z. B. von Glyzerin, bestimmten Zuckerarten und Aminosäuren. Er meint hierzu: „Sehr gering ist jedoch die Wahrscheinlichkeit, daß es innerhalb von isolierten Fermentlösungen zu einer Neubildung von Fermenten kommt, wohl aber können sich in solchen Konstellationen ergeben, unter denen Fermente, die unter den zunächst vorhandenen nicht zur Wirkung gelangen konnten, wirksam werden.“ Außerdem hielt er Aenderungen am Träger für möglich, die vorher gehemmte Enzymwirkungen auslösen. — Bergmann und Schleich haben Enzyme, Dehydropolypeptidasen, gefunden, die nur Dehydropolypeptide spalten.

---

[1]) Die Tyrosinkomponente des Tripeptids bestand nach der optischen Analyse seiner Hydrolysenprodukte und nach den übereinstimmenden Ergebnissen des enzymatischen Abbaues zu 80% aus l-, zu 20% aus d,Tyrosin, war also teilweise racemisiert.

In kurzer Zusammenfassung nun:

Im Pankreas sind enthalten die eiweißspaltenden Enzyme:

Trypsin		und	Erepsin	
Das Trypsin besteht	1. aus der Proteinase, die Proteine angreift und der Aktivierung der Enterokinase bedarf;		Das Erepsin besteht	1. aus der Dipeptidase, die nur Dipeptide spaltet;
	2. aus der Carboxy-Polypeptidase, deren Affinität an die Carboxylgruppe eines Polypeptids gebunden ist und der Aktivierung von Enterokinase bedarf; ihr Wirkungsbereich wird erweitert;			2. aus der Amino-Poly-Peptidase, deren Affinität an die Aminogruppe gebunden ist.
	3. aus der Protaminase, die Protamine angreift und Arginin abspaltet und der Aktivierung von Enterokinase nicht bedarf.			

Am Schluß der Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. A. Hahn für die Ueberlassung des Themas und Uebernahme des Referats meinen besten Dank auszusprechen.

Literatur

1. Abderhalden: Lehrbuch der physiolog. Chemie 1931.
2. Bergmann u. H. Schleich: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 205 S. 65, Bd. 207 S. 235, 1931/32.
3. Graßmann H. Dykerhoff u. O. v. Schönebeck: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 186 S. 183, 1929.
4. Mays: Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 49 S. 124 u. Bd. 51 S. 182, 1906.
5. Oppenheimer: Chemische Grundlagen der Lebensvorgänge, 1933.
6. Oppenheimer u. R. Kuhn: Lehrbuch der Enzyme, 1927.
7. Oppenheimer-Kuhn: Die Fermente, S. 450 und 875, 1925.
8. Vernon: Journal of Physiol. Bd. 30 S. 330, 1903.
9. Vernon: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 50 S. 440, 1906.
10. Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 132 S. 181, 1924.
11. Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 142 S. 217, 1925.
12. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls und J. Waldschmidt-Graser: Chem. Ber. Bd. 62 S. 956, 1929.
13. Waldschmidt-Leitz, A. K. Balls: Chem. Ber. Bd. 63 S. 1203, 1930.
14. Waldschmidt-Leitz-J. Waldschmidt-Graser: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 166 S. 247, 1927.
15. Waldschmidt-Leitz u. A. Harteneck: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 147 S. 286, 1925.
16. Waldschmidt-Leitz, A. Harteneck: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 149 S. 203 und 221, 1925.
17. Waldschmidt-Leitz u. F. Kofranyi: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 222 S. 148, 1933.
18. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr: Chem. Ber. Bd. 62 S. 2217, 1929.
19. Waldschmidt-Leitz-A. Schäffner: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 151 S. 35, 1926.
20. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner u. W. Graßmann: Zeitschrift f. physiol. Chem. Bd. 156 S. 69, 1926.
21. Waldschmidt-Leitz, A. Schäffner u. L. Weil: Bd. 197 S. 219, 1931.
22. Willstätter u. W. Graßmann: Bd. 138 S. 204, 1924.
23. Willstätter u. H. Kraut: Chem. Ber. Bd. 56 S. 1177, 1923.
24. Willstätter u. H. Persiel: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 142 S. 244, 1925.
25. Willstätter u. E. Waldschmidt-Leitz: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 125 S. 132, 1922.
26. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, S. Dunaiturra u. G. Künstner: Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. 161 S. 191, 1926.

Lebenslauf

Am 10. Februar 1911 wurde ich in Aachen (Rhld.) geboren als Tochter des Architekten Josef Bachmann und seiner Frau Lina, geb. Müller. Dort besuchte ich das Oberlyzeum „Viktoria-Schule“ (Studienanstalt mit Oberrealschulrichtung) und bestand am 10. März 1930 die Reifeprüfung. Ich begann mein zahnmedizinisches Studium in Heidelberg und legte nach 3 Semestern dort am 4. Mai 1932 die zahnärztliche Vorprüfung ab. Nach weiteren 4 Semestern in Würzburg und München bestand ich am 12. Juni 1934 die zahnärztliche Staatsprüfung in München.

München, November 1934.